

培養マウス表皮細胞のデスモソーム形成に対する 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ の作用

金沢大学医学部皮膚科学講座 (主任: 広根孝衛教授)

山 本 善 明

(昭和61年12月10日受付)

表皮細胞の細胞膜の分化に対する 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ (1 α , 25(OH)₂D₃) の作用を検討するため、マウス新生仔から得られた表皮細胞を 1 α , 25(OH)₂D₃ (12 nM) 添加高カルシウムおよび低カルシウム培養液中で 24 時間巡回培養し、培養表皮細胞において新たに形成されるデスモソームを定量的に検索した。1 α , 25(OH)₂D₃ 添加高カルシウム培養液中で培養された表皮細胞では、細胞表面に形成されるデスモソームの数は培養時間の延長とともに増加したが、細胞表面の単位長当りのデスモソーム数は 1 α , 25(OH)₂D₃ 未添加高カルシウム培養液中で培養された表皮細胞 (対照) における値と有意に異ならなかった。しかし、培養 5 時間後から 24 時間後まで、ステージ I デスモソームの比率は対応する対照値より有意に低く、ステージ III デスモソームの比率は有意に高かった。低カルシウム培養液中で培養された表皮細胞では、1 α , 25(OH)₂D₃ を添加した場合も添加しなかった場合も、デスモソームの形成は全く認められなかった。得られた成績から、1 α , 25(OH)₂D₃ は培養表皮細胞におけるデスモソーム形成の初発機構の誘導には関与しないが、デスモソームの発達過程には促進的に作用することが示唆された。

Key words 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃, epidermal cell, desmosome

皮膚がビタミン D₃ 合成の場として重要であることはよく知られている。表皮では、紫外線照射によりプロビタミン D₃ (7-dehydrocholesterol) がプレビタミン D₃ を経てビタミン D₃ (cholecalciferol) へと転換される¹⁾。ビタミン D 結合蛋白と結合したビタミン D₃ は皮膚から循環血中に移行し、肝で水酸化されて 25-hydroxyvitamin D₃ (25 OHD₃) となり、次いで腎で水酸化されて 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ (1 α , 25(OH)₂D₃) となる²⁾。近年、1 α , 25(OH)₂D₃ と特異的に結合するレセプターの存在が皮膚³⁾⁻⁶⁾や他の種々の組織⁷⁾⁻¹¹⁾で証明され、これらの組織がこのホルモンのターゲットであることが示唆された。それと並行してその生物学的作用も検討され、1 α , 25(OH)₂D₃ は若干の腫瘍細胞系の増殖と分化に関与することが報告された¹²⁾⁻¹⁶⁾。また最近、1 α , 25(OH)₂D₃ が皮膚の細胞の増殖と分化に関与することも示唆されている。Clemens

ら³⁾は、in vitro で正常ヒト皮膚の線維芽細胞の増殖に対する 1 α , 25(OH)₂D₃ および 25 OHD₃ の作用を検討し、前者は著明な増殖抑制作用を示すのに対して、後者は前者のレセプターに対する親和性も低く、増殖抑制作用も弱いことを示した。さらに、Hosomi ら¹⁷⁾および Smith ら¹⁸⁾は、培養表皮細胞の分化に対する 1 α , 25(OH)₂D₃ の促進的作用を示唆する実験成績を報告している。

そこで、著者は、表皮細胞を 1 α , 25(OH)₂D₃ 添加高カルシウムおよび低カルシウム培養液中で巡回培養し、細胞膜の分化、特にデスモソーム形成に対する 1 α , 25(OH)₂D₃ の影響を検討した。

材料および方法

I. 表皮細胞培養法

BALB/c マウスの新生仔数匹から採取した皮膚片

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; Ca⁺⁺, calcium; 1 α , 25(OH)₂D₃, 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃; ³H-TdR, ³H-thymidine deoxyribose; MEM, minimum essential medium; Mg⁺⁺, magnesium; PBS, phosphate buffered saline; 光顕, 光学顕微鏡; 電顕, 電子顕微鏡。

を Ca^{++} ・ Mg^{++} を含まない Dulbecco リン酸緩衝塩類溶液 (PBS, pH 7.2) で洗浄したのち, 0.02% EDTA 含有 PBS に室温で 5~10 分間浸漬, 次に 0.25% トリプシン (Difco) 含有 PBS に 4°C で 18~20 時間浸漬し, 表皮を真皮から剥離した。剥離表皮を培養液中で強く振盪して表皮細胞を分散させたのち, 75 μm ステンレスメッシュで濾過して単離表皮細胞浮遊液を調製した。なお, 浮遊液中の細胞がすべて単離細胞であることを位相差顕微鏡で確認したのち, これを培養に供した。

培養には, 高カルシウムおよび低カルシウム培養液を用いた。高カルシウム培養液は, ペニシリン (50 units/ml), ストレプトマイシン (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), ウシ胎児血清 (20%) を加えた Hanks' liquid MEM (M. A. Bioproducts) で, その Ca^{++} 濃度は 1.8 mM であった。低カルシウム培養液は, Ca^{++} ・ Mg^{++} を含まない Hanks' balanced salt solution (M. A. Bioproducts) を用いて作った Hanks' liquid MEM に, 0.3 M MgSO_4 を加えて Mg^{++} 濃度を高カルシウム培養液のそれと同じに調整し, これにペニシリン (50 units/ml), ストレプトマイシン (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), およびカルシウムを除去したウシ胎児血清 (20%) を加えたのち, 0.3 M CaCl_2 を添加し, Ca^{++} 濃度を 0.09 mM に調整した。ウシ胎児血清からのカルシウム除去は, Brennan¹⁹⁾の方法に従い, Chelex 100 (Bio-Rad, 200-400 メッシュ) を用いて行った。使用直前にこれらの培養液に $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Hoffmann-La Roche) エタノール液を加え, その濃度を 12 nM (5.0 ng/ml) に調整した。なお, 対照の培養液には同量のエタノールを添加した。

旋回培養は Moscona²⁰⁾の方法に準じておこなった。すなわち, 培養液 3.5 ml 中に単離表皮細胞 5×10^6 個を分散し, これをシリコンでコーティングしたマイヤーフラスコ (30 ml 容量) に入れ, 5%炭酸ガス添加空気で封入し, 遮光して培養した。培養には恒温槽付旋回培養装置 (池本理化学工業) を使用し, 旋回直径を 25 mm, 旋回速度を 60 rpm, 恒温槽の温度を 37°C とした。培養 1, 3, 5, 8, 12, 18, 24 時間後, 旋回培養により形成された表皮細胞塊を電子顕微鏡的に検索した。

II. 電子顕微鏡法

旋回培養により形成された表皮細胞塊 (直径 0.1~0.4 mm) を遠心管に移し, 0.1 M カコジル酸塩緩衝 3% グルタルアルデヒド液 (pH 7.4) に 4°C で 2~4 時間固定, 0.2 M 蔗糖添加カコジル酸塩緩衝液で数回洗浄後, 3% 寒天 (ドータイト・アガロース I, 同仁化学) に包埋した。表皮細胞塊を含む寒天の小片

を切り出し, これをペロナール酢酸塩緩衝 2% オスミウム酸 (pH 7.4) に 4°C で 2 時間固定, アセトン系列で脱水後エボン 812 に包埋した。LKB V 型ウルトラトームで作製した切片を酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛で染色後, 日本電子 JEM100B 型および日立 H-600 型電子顕微鏡 (電顕) で検索した。電顕写真は表皮細胞塊 1 個について 30 枚を無作為に撮影した。写真は 9000 または 10000 倍で撮影し, 30000 倍で焼付けした。

III. 推計学的方法

各培養時間におけるデスモソームの数はいずれも細胞表面の長さ 1 μm 当りの数で表わした。細胞表面の長さはマップメジャーを用いて測定した。また, デスモソームのステージ別比率を各ステージのデスモソーム数のデスモソーム総数に対する百分率で表わした。デスモソームの総数およびステージ別デスモソームの比率について, 各培養時期の $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 添加群の値と対応する対照値との差は, 二元配置分散分析により検定し, 次に Scheffé の多重比較法により検定した。なお, ステージ別デスモソームの比率は Probit 変換後の値を用いた。

成 績

I. $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 未添加高カルシウム培養液中における培養表皮細胞

培養液中に分散された表皮細胞は, 培養 1 時間後には集合して直径 0.1~0.4 mm 細胞塊を形成した。電顕下で, 表皮細胞はすべて類円形を呈し, 互いに狭い空隙を隔てて隣接していた。表皮細胞の形質膜には, トリプシン処理により生じた半デスモソーム様構造と新しく形成されたデスモソームが不規則に存在していた。その後, 半デスモソーム様構造は減少し, 種々の発達段階のデスモソームが増加した。微細構造上デスモソームの発達段階には次の 3 期が識別された。すなわち, ステージ I デスモソームでは, 相対する 2 枚の形質膜が約 25 nm の狭い間隙を隔てて平行に並び, その間隙内には低電子密度の細胞間物質がみられた (図 1)。細胞間物質は無構造であるが, 時に間隙を横切る細線維状物が少数認められた。ステージ II デスモソームでは, 細胞間物質内により多くの細線維状物が存し, 細線維状物の中点を結ぶ層状構造, すなわち細胞間接着層がみられた。さらに, 形質膜内葉の内面に密接して存在する接着板が認められた (図 2)。ステージ III デスモソームでは, 細胞間接着層も接着板もより明瞭であり, また接着板の内面に種々の数のトノフィラメントが係留されている像がみられた (図 3)。

種々のステージのデスモソームの総数は培養時間の延長とともに増加した (図 4)。すなわち, 細胞表面の

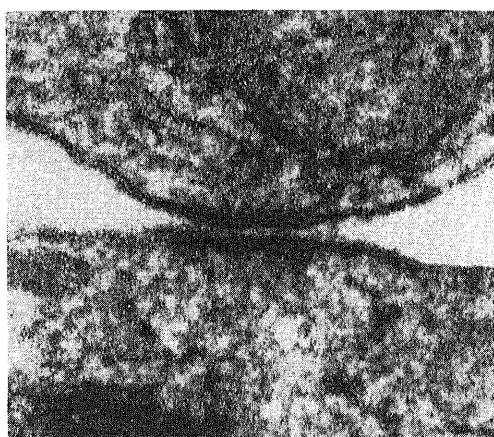


Fig. 1. Stage I desmosome seen in adjacent epidermal cells cultured for 1 hour in high calcium medium. $\times 200,000$.

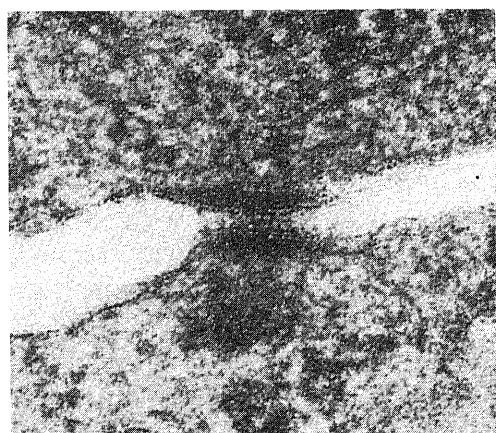


Fig. 2. Stage II desmosome seen in adjacent epidermal cells cultured for 8 hours in high calcium medium. $\times 150,000$.

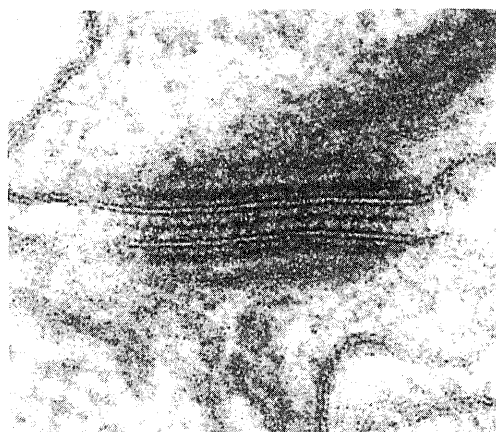


Fig. 3. Stage III desmosome seen in adjacent epidermal cells cultured for 24 hours in high calcium medium. $\times 150,000$.

長さ $1\mu\text{m}$ 当りのデスモソーム数は、1 時間後には 0.08 個であったが、その後急速に増加して 12 時間後には 0.21 個となり、以後徐々に増加して 24 時間後には 0.24 個となった。また、各ステージのデスモソームの割合も培養時間の延長に伴う変動を示した (表 1, 図 5)。すなわち、1 時間後にはステージ I, II デスモソームがそれぞれ 67.5%, 32.5% で、ステージ III デスモソームはまだ認められなかった。3 時間後にステージ III デスモソームがごく少数出現し、その後培養時間の進行とともにステージ I デスモソームの比率は減少し、他方ステージ III デスモソームの比率が増加した。24 時間後にステージ I, III デスモソームの比率はそれぞれ 8.4%, 40.1% となった。

II. $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 添加高カルシウム培養液中における培養表皮細胞

$1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 添加高カルシウム培養液中で培養された表皮細胞は、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 未添加高カルシウム培養液中で培養された表皮細胞 (対照) と同様に、1 時間後には集合して細胞塊を形成し、個々の表皮細胞の表面には新しく形成された早期のデスモソームが少数みられた。その後、培養時間の延長とともに種々の発達段階のデスモソームが増加した (図 4)。細胞表面の長さ $1\mu\text{m}$ 当りのデスモソーム数は、1, 12, 24 時間後それぞれ 0.11, 0.23, および 0.26 個で、培養期間中ほとんど常に対応する対照値よりも高かった

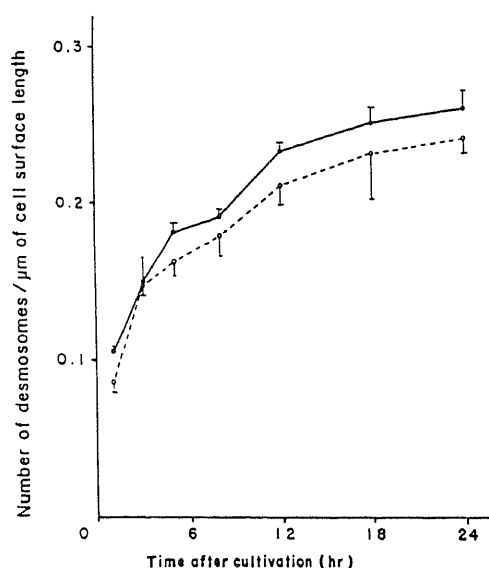


Fig. 4. Frequency of desmosome formation in epidermal cells cultured in high calcium medium in the presence (closed circle) or absence (open circle) of $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ at 12nM. Values represent the mean of four samples \pm S.D.

が、有意の差は認められなかった。各ステージのデスモソームの割合も経時的に変動し、培養時間の延長とともにステージ I デスモソームの比率は減少し、ステージ III デスモソームの比率は増加した (表 1, 図 5)。興味深いことに、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 添加高カルシ

ウム培養液中で培養された表皮細胞では、ステージ I デスモソームの比率は 5 時間後から 24 時間後まで、ステージ II デスモソームの比率は 8 時間後から 24 時間後まで、いずれも対応する対照値より有意に低く、ステージ III デスモソームの比率は 5 時間後から 24 時間

Table 1. The relative numbers of different stages of desmosomes in epidermal cells cultured in high calcium medium with and without $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$

Culture period	Medium	Relative numbers of desmosomes (% of total)		
		Stage I	Stage II	Stage III
1 hr	with	65.5 ± 1.8	34.5 ± 1.8	0 ± 0
	without	67.5 ± 2.1	32.5 ± 2.1	0 ± 0
3 hr	with	54.8 ± 1.2	44.7 ± 1.4	0.6 ± 0.8
	without	54.3 ± 2.3	45.3 ± 2.2	0.4 ± 0.5
5 hr	with	$34.4 \pm 1.0^*$	$55.8 \pm 0.7^*$	$9.8 \pm 1.1^*$
	without	46.0 ± 1.2	51.1 ± 1.5	2.9 ± 1.1
8 hr	with	$11.7 \pm 1.6^*$	$58.2 \pm 0.9^*$	$30.1 \pm 1.4^*$
	without	21.2 ± 2.4	68.2 ± 2.0	10.7 ± 1.6
12 hr	with	$9.7 \pm 0.7^*$	$53.2 \pm 1.5^*$	$37.1 \pm 1.1^*$
	without	16.1 ± 1.0	64.2 ± 1.3	19.7 ± 0.4
18 hr	with	$1.5 \pm 0.8^*$	$51.6 \pm 1.4^*$	$46.9 \pm 1.6^*$
	without	10.5 ± 2.0	66.2 ± 1.3	23.3 ± 1.2
24 hr	with	$0.6 \pm 0.2^*$	$45.7 \pm 1.5^*$	$53.7 \pm 1.4^*$
	without	8.4 ± 2.3	51.5 ± 2.5	40.1 ± 2.1

Values represent the mean of four samples \pm S.D. The data were analysed for statistical significance by 2-way ANOVA followed by Scheffe's multiple comparison test. * $p < 0.01$ vs. without.

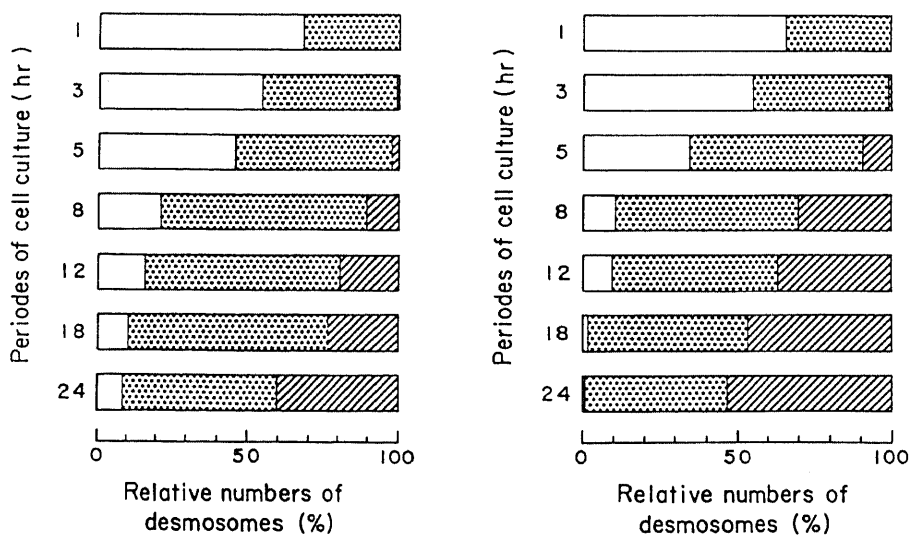


Fig. 5. Comparison of the mean values of the relative numbers of different stages of desmosomes formed in high calcium medium in the presence (right) and absence (left) of $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$. □: Stage I, ▤: Stage II, ▨: Stage III desmosome.

後まで対応する対照値よりも有意に高かった。24 時間後には、ほとんどすべてのデスモソームはステージ II, III であった。

III. 1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ 添加または未添加低カルシウム培養液中における培養表皮細胞

低カルシウム培養液中での培養では、1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ を添加した場合も添加しなかった場合も、表皮細胞は小塊状に集合したが、培養期間中隣接細胞が新しく形成されたデスモソームにより互いに接合される像は認められなかった。

考 察

表皮細胞は、それが基底層から角質層へ移行しつつ分化する過程で、ケラチン線維と線維間物質を合成し、肥厚した細胞被膜を形成し、核を含む細胞小器官を喪失する。これらの特徴的な変化のうち、細胞被膜の肥厚は、デスモソームの形成とその変化とともに、表皮細胞の細胞膜分化の過程における主要な問題として従来研究され、情報も蓄積されてきた。電顕的に、肥厚した細胞被膜は表皮細胞の分化の最終段階である角質細胞で認められ、それは 3 層構造の形質膜とその内葉の内面（細胞質側の面）に沿って走る、10~16 nm の厚さの、均質な帯状構造から成る。帯状構造はデスモソームの接着板に接続し、結果として細胞の全周に連続的な層を形成する。この帯状構造は、周辺帯 (marginal band)²¹⁾ または peripheral dense band²²⁾ と呼ばれ、ヒトの正常表皮では通常角質層の細胞でみられるが、異常な角化を示す若干の皮膚疾患の病巣では角質層直下の顆粒細胞でも時に認められる²³⁾。他方、周辺帯の主成分は不溶性蛋白であり、その不溶性蛋白を安定化させる ϵ -(γ -glutamyl) lysine cross-linking bond の形成には架橋酵素 epidermal transglutaminase が関与することが、生化学的に証明されている²⁴⁾。

このような表皮細胞の分化に関与する因子の一つとして、最近 1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ が注目されてきた。Hosomi ら¹⁷⁾ は、シャーレ内で分散培養されたマウス表皮細胞に 1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ を添加すると、表皮細胞の重層化が著明に促進されるとともに核を失った角質細胞が増加することを光顕的に観察した。また、ドデシル硫酸ナトリウムおよび β -メルカプトエタノール処理後細胞融解を起こすことなく残存する細胞を肥厚した細胞被膜を有する細胞と見なし、そのような細胞は 1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ の濃度に依存的に増加したと述べている。次いで Smith ら¹⁸⁾ は、ヒト表皮細胞を 1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ (10^{-10} M~ 10^{-6} M) 添加培養液中で 2 週間培養し、基底細胞の減少ならびに肥厚した細胞被膜を有する角質細胞の増加が 1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ の濃度およ

び培養時間に依存的に進行することを形態学的に示した。また、培養表皮細胞への 3 H-TdR 取り込みの有意の減少と、transglutaminase 活性の濃度依存的亢進を生化学的に検証した。これらの成績に基づいて、彼らは、1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ は表皮細胞に対する有力な増殖抑制因子であり、またその分化の最終段階に対する刺激物質であろうと述べている。これらの実験成績について興味深いことは、1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ の存在下で培養表皮細胞の transglutaminase 活性が亢進することであり、また肥厚した細胞被膜を有する角化細胞が増加することである。それは恐らく、transglutaminase 活性の亢進により周辺帯の形成が促進され、その結果として細胞被膜の肥厚が促進されるものと考えられる。

この実験で、著者は 12 nM 1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ 添加高カルシウム培養液中でマウス表皮細胞を 24 時間培養し、新しく形成されるデスモソームの数は対照値と有意に異ならないが、培養 5~24 時間後では、ステージ I デスモソームの比率は対応する対照値よりも有意に低く、ステージ III デスモソームの比率は有意に高いことを観察した。著者の観察は、培養表皮細胞におけるデスモソーム形成の初発機構はレセプターと結合した 1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ による誘導を受けないが、デスモソームが未熟な形から完全な形にまで発達する過程は 1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ により促進されることを示唆している。

デスモソームの接着板は表皮細胞の分化の最終段階で周辺帯と接続して連続的な層を形成すること²³⁾、また周辺帯の主成分である不溶性蛋白のペプチド間の ϵ -(γ -glutamyl) lysine cross-linking bond の形成を触媒する epidermal transglutaminase の活性は 1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ の存在下で亢進すること¹⁸⁾ がすでに示されているが、これらの知見を考慮に入れるならば、epidermal transglutaminase が接着板形成に関与することを示す直接的な証拠はまだないが、周辺帯形成に対すると同様に、1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ が epidermal transglutaminase を介して接着板形成に促進的に作用する可能性が推測される。著者の実験において、培養 5~24 時間後でステージ I デスモソームの比率が対応する対照値よりも低かったことは、接着板形成の促進によるステージ I の時間的短縮を示唆するように思われる。

イオン化したカルシウムが表皮細胞の増殖と分化に大きい影響を与えることは既によく知られている。シャーレ内で培養されたマウス表皮細胞は、低カルシウム (0.02~0.1 mM) 培養液中で急速に増殖し、数か月後でも単層で重層せず、細胞間隙は広く、細胞表面に多数の微絨毛を出し、デスモソームを形成しないが、高カルシウム (1.2~1.8 mM) 培養液中では細胞は 2

時間以内に急速に接着してデスモソームを形成し、1～2日で重層し、3～4日で最終段階の分化を示し、細胞はシャーレから離れて浮上する^{25)～27)}。同様の現象は培養ヒト表皮細胞でも報告されている²⁸⁾²⁹⁾。Hosomiら¹⁷⁾は、低カルシウム培養液中の培養マウス表皮細胞に対する $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の影響を検討し、角化した無核細胞は生じなかったが、肥厚した細胞被膜の形成が $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の濃度依存的に増加したと述べている。しかし、その細胞被膜の肥厚が周辺帯形成によるか否かを電顕的に確認していない点に問題が残されている。著者の実験では、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 添加低カルシウム培養液中では、未添加低カルシウム培養液中におけると同様に、デスモソームの形成は全く認められなかった。この所見は、レセプターと結合した $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ がデスモソーム形成の初発機構の誘導に関与しないことを示唆するものと解釈された。

結 論

マウス新生仔から得られた表皮細胞を $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 添加高カルシウムおよび低カルシウム培養液中で24時間旋回培養し、新たに形成されたデスモソームを定量的に検索した。得られた成績は次のようである。

1. $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 未添加高カルシウム培養液中で培養された表皮細胞では、細胞表面にデスモソームが形成され、その数は培養時間の延長とともに増加した。なお、これらのデスモソームは発達段階に従い3期に分けられた。

2. $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 添加高カルシウム培養液中で培養された表皮細胞でも、細胞表面に形成されるデスモソームの数は培養時間の延長とともに増加したが、細胞表面の単位長当りのデスモソーム数は $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 未添加高カルシウム培養液中で培養された表皮細胞(対照)における値と有意に異ならなかった。しかし、培養5時間後から24時間後まで、ステージIデスモソームの比率は対応する対照値より有意に低く、ステージIIIデスモソームの比率は有意に高かった。

3. 低カルシウム培養液中で培養された表皮細胞では、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を添加した場合も添加しなかった場合も、デスモソームの形成は全く認められなかった。

以上の成績から、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は培養表皮細胞におけるデスモソーム形成の初発機構の誘導には関与しないが、デスモソームが未熟な形から完全な形にまで発達する過程には促進的に作用することが推測された。

謝 辞

稿を終えるに当たり、御指導および御校閲いただきました

広根孝衛教授、ならびに資料の推計学的処理法について御助言いただきました金沢大学医学部衛生学教室橋本和夫教授に深甚の謝意を表します。なお、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の提供を受けた日本ロシュ株式会社に謝意を表します。

文 献

- 1) Holick, M. F.: The cutaneous photosynthesis of previtamin D_3 : A unique photoendocrine system. *J. Invest. Dermatol.*, **77**, 51-58 (1981).
- 2) DeLuca, H. F. & Schnoes, H. K.: Vitamin D. Recent advances. *Annu. Rev. Biochem.*, **52**, 411-439 (1983).
- 3) Clemens, T. L., Adams, J. S., Horiuchi, N., Gilchrist, B. A., Cho, H., Tsuchiya, Y., Matsuo, N., Suda, T. & Holick, M. F.: Interaction of 1, 25-dihydroxyvitamin D_3 with keratinocytes and fibroblasts from skin of normal subjects and a subject with vitamin-D-dependent rickets, type II: A model for study of the mode of action of 1, 25-dihydroxyvitamin D_3 . *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **56**, 824-830 (1983).
- 4) Feldman, D., Chen, T., Hirst, M., Colston, K., Karasek, M. & Cone, C.: Demonstration of 1, 25-dihydroxyvitamin D_3 receptors in human skin biopsies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **51**, 1463-1465 (1980).
- 5) Eil, C. & Marx, S. J.: Nuclear uptake of 1, 25-dihydroxy [^3H] cholecalciferol in dispersed fibroblasts cultured from normal human skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2562-2566 (1981).
- 6) Simpson, R. U. & DeLuca, H. F.: Characterization of a receptorlike protein for 1, 25-dihydroxyvitamin D_3 in rat skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5822-5826 (1980).
- 7) Chandler, J. S., Pike, J. W. & Haussler, M. R.: 1, 25-dihydroxyvitamin D_3 receptors in rat kidney cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**, 1057-1063 (1979).
- 8) Christakos, S. & Norman, A. W.: Studies on the mode of action of calciferol IX^{III}. Evidence for a specific high affinity binding protein for 1, 25-dihydroxyvitamin D_3 in chick kidney and pancreas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **89**, 56-63 (1979).
- 9) Reinhardt, T. A. & Conrad, H. R.: Specific binding protein for 1, 25-dihydroxyvitamin D_3 in bovine mammary gland. *Arch. Biochem. Biophys.*, **203**, 108-116 (1980).

- 10) Reinhardt, T. A., Horst, R. L., Littledike, E. T. & Beitz, D. C.: 1, 25-dihydroxyvitamin D $_3$ receptor in bovine thymus gland. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **106**, 1012-1018 (1982).
- 11) Hughes, M. R. & Haussler, M. R.: 1, 25-dihydroxyvitamin D $_3$ receptors in parathyroid glands. Preliminary characterization of cytoplasmic and nuclear binding components. *J. Biol. Chem.*, **253**, 1065-1073 (1978).
- 12) Freake, H. C., Spanos, E., Eisman, J. A., Galasko, C. S. B., Martin, T. J. & MacIntyre, I.: Specific binding of 1, 25-dihydroxyvitamin D $_3$ in the VX $_2$ carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **97**, 1505-1511 (1980).
- 13) Colston, K., Colston, M. J. & Feldman, D.: 1, 25-dihydroxyvitamin D $_3$ and malignant melanoma: the presence of receptors and inhibition of cell growth in culture. *Endocrinology*, **108**, 1083-1086 (1981).
- 14) Abe, E., Miyaura, C., Sakagami, H., Takeda, M., Konno, K., Yamazaki, T., Yoshiki, S. & Suda T.: Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 α , 25-dihydroxyvitamin D $_3$. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4990-4994 (1981).
- 15) Miyaura, C., Abe, E., Kuribayashi, T., Tanaka, H., Konno, K., Nishii, Y. & Suda, T.: 1 α , 25-dihydroxyvitamin D $_3$ induces differentiation of human myeloid leukemia cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **102**, 937-943 (1981).
- 16) Tanaka, H., Abe, E., Miyaura, C., Kuribayashi, T., Konno, K., Nishii, Y. & Suda, T.: 1 α , 25-dihydroxycholecalciferol and a human myeloid leukemia cell line (HL-60). The presence of a cytosol receptor and induction of differentiation. *Biochem. J.*, **204**, 713-719 (1982).
- 17) Hosomi, J., Hosoi, J., Abe, E., Suda, T. & Kuroki, T.: Regulation of terminal differentiation of cultured mouse epidermal cells by 1 α , 25-dihydroxyvitamin D $_3$. *Endocrinology*, **113**, 1950-1957 (1983).
- 18) Smith, E. L., Walworth, N. C. & Holick, M. F.: Effect of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D $_3$ on the morphologic and biochemical differentiation of cultured human epidermal keratinocytes grown in serum-free conditions. *J. Invest. Dermatol.*, **86**, 709-714 (1984).
- 19) Brennan, J. K., Mansky, J., Roberts, G. & Lichtman, M. A.: Improved methods for reducing calcium and magnesium concentrations in tissue culture medium: Application to studies of lymphoblast proliferation in vitro. *In Vitro*, **11**, 354-360 (1975).
- 20) Moscona, A.: Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells. *Exp. Cell Res.*, **22**, 455-475 (1961).
- 21) Hashimoto, K.: Cellular envelopes of keratinized cells of the human epidermis. *Arch. klin. exp. Derma.*, **235**, 374-385 (1969).
- 22) Farbman, A. I.: Plasma membrane changes during keratinization. *Anat. Rec.*, **156**, 269-282 (1966).
- 23) Hirone, T. & Eryu, Y.: Cellular envelope changes during differentiation of human epidermal cells. In Seiji, M. & Bernstein, I. A. (eds.), *Biochemistry of Cutaneous Epidermal Differentiation*, 1st ed., p.81-92, University of Tokyo Press, Tokyo, 1977.
- 24) Ogawa, H. & Goldsmith, L. A.: Human epidermal transglutaminase: Preparation and properties. *J. Biol. Chem.*, **251**, 7281-7288 (1976).
- 25) Hennings, H., Michael, D., Cheng, C., Steinert, P., Holbrook, K. & Yuspa, S. H.: Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell*, **19**, 245-254 (1980).
- 26) Hennings, H., Holbrook, K., Steinert, P. & Yuspa, S.: Effects of extra-cellular calcium. In Bernstein, I.A. & Seiji, M. (eds.), *Biochemistry of Normal and Abnormal Epidermal Differentiation*, 1st ed., p.3-22, University of Tokyo Press, Tokyo, 1980.
- 27) Hennings, H. & Holbrook, K. A.: Calcium regulation of cell-cell contact and differentiation of epidermal cells in culture. *Exp. Cell Res.*, **143**, 127-142 (1983).
- 28) Hawley-Nelson, P., Sullivan, J. E., Kung, M., Hennings, H. & Yuspa, S. H.: Optimized conditions for the growth of human epidermal cells in culture. *J. Invest. Dermatol.*, **75**, 176-182 (1980).
- 29) Watt, F. M., Matthey, D. L. & Garrod, D. R.: Calcium-induced reorganization of desmosomal components in cultured human keratinocytes. *J. Cell Biol.*, **99**, 2211-2215 (1984).

Effect of $1\alpha, 25$ -Dihydroxyvitamin D_3 on the Desmosome Formation in Mouse Epidermal Cells in Culture Yoshiaki Yamamoto, Department of Dermatology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med. Soc., **95**, 991—998 (1986)

Key words: $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D_3 , epidermal cell, desmosome.

Abstract

The effect of $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D_3 [$1\alpha, 25(OH)_2D_3$] on desmosome formation in cultured mouse epidermal cells was studied by quantitative electron microscopy. For analyses, the frequency of desmosome formation was expressed as the number of desmosomes per micrometer of cell surface length, and the relative numbers of different stages of desmosomes were expressed as percentages of a total number of desmosomes. Although the frequency of desmosome formation in epidermal cells cultured in high calcium with $1\alpha, 25(OH)_2D_3$ (12 nM) increased rapidly from 1 to 24 hrs, the values did not differ significantly from those in cells incubated in the medium without $1\alpha, 25(OH)_2D_3$ (controls). However, during the period from 5 to 24 hrs, the relative numbers of the early (stage I) desmosomes were significantly lower than those in the corresponding controls, and the relative number of the fully developed (stage III) desmosomes were significantly higher than those in the corresponding controls. No desmosome formation was seen in the cultures in low calcium medium with and without $1\alpha, 25(OH)_2D_3$. The results obtained suggest that $1\alpha, 25(OH)_2D_3$ accelerates the developmental process of desmosomes, although it does not induce the initiation of the desmosome formation.